

凝胶迁移实验 (EMSA)

凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA) 可以: (1) 研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用; (2) 可用于 DNA 定性和定量分析; (3) 用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。

凝胶迁移或电泳迁移率实验 (EMSA-electrophoretic mobility shift assay) 是一种研究 DNA 结合蛋白和其相关的 DNA 结合序列相互作用的技术, 可用于定性和定量分析。这一技术最初用于研究 DNA 结合蛋白, 目前已用于研究 RNA 结合蛋白和特定的 RNA 序列的相互作用。通常将纯化的蛋白和细胞粗提液和 ^{32}P 同位素标记的 DNA 或 RNA 探针一同保温, 在非变性的聚丙烯凝胶电泳上, 分离复合物和非结合的探针。DNA-复合物或 RNA-复合物比非结合的探针移动得慢。同位素标记的探针依研究的结合蛋白的不同, 可是双链或者是单链。当检测如转录调控因子一类的 DNA 结合蛋白, 可用纯化蛋白, 部分纯化蛋白, 或核细胞抽提液。在检测 RNA 结合蛋白时, 依据目的 RNA 结合蛋白的位置, 可用纯化或部分纯化的蛋白, 也可用核或胞质细胞抽提液。竞争实验中采用含蛋白结合序列的 DNA 或 RNA 片段和寡核苷酸片段 (特异), 和其它非相关的片段 (非特异), 来确定 DNA 或 RNA 结合蛋白的特异性。在竞争的特异和非特异片段的在下, 依据复合物的特点和强度来确定特异结合。

DNA 样品

[γ - ^{32}P]ATP、T4 多聚核苷酸激酶、Nuclease-Free Water、T4 多聚核苷酸激酶缓冲液、醋酸铵、TE、无水乙醇、TBE buffer、重蒸水、甲叉双丙烯酰胺、丙烯酰胺、甘油、过硫酸铵、TEMED (四甲基乙二胺)、EMSA Gel-Shift 结合缓冲液、溴酚蓝等

水浴锅、PCR 仪、离心机、电泳仪、电泳槽等

一、探针的标记

1. 如下设置探针标记的反应体系:

- (1) 待标记探针 (1.75 pmol/微升): 2 微升。
- (2) T4 Polynucleotide Kinase Buffer (10X): 1 微升。
- (3) Nuclease-Free Water: 5 微升。

(4) [γ -³²P]ATP(3 000 Ci/mmol at 10 mCi/ml) : 1 微升。

(5) T4 Polynucleotide Kinase (5-10 u/微升) : 1 微升。

(6) 总体积: 10 微升

(7) 按照上述反应体系依次加入各种试剂, 加入同位素后, Vortex 混匀, 再加入 T4 Polynucleotide Kinase, 混匀。

2. 使用水浴或 PCR 仪, 37°C 反应 10 分钟。

3. 加入 1 微升探针标记终止液, 混匀, 终止探针标记反应。

4. 再加入 89 微升 TE, 混匀。此时可以取少量探针用于检测标记的效率。通常标记的效率在 30% 以上, 即总放射性的 30% 以上标记到了探针上。为实验简便起见, 通常不必测定探针的标记效率。

5. 标记好的探针最好立即使用, 最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在 -20°C。

二、探针的纯化

通常为实验简便起见, 可以不必纯化标记好的探针。在有些时候, 纯化后的探针会改善 EMSA 的电泳结果。如需纯化, 可以按照如下步骤操作

1. 对于 100 微升标记好的探针, 加入 1/4 体积即 25 微升的 5 M 醋酸铵, 再加入 2 体积即 200 微升的无水乙醇, 混匀。

2. 在 -70°C 至 -80°C 沉淀 1 小时, 或在 -20°C 沉淀过夜。

3. 在 4°C, 12 000 g-16 000 g 离心 30 分钟。小心去除上清, 切不可触及沉。

4. 在 4°C, 12 000 g-16 000 g 离心 1 分钟。小心吸去残余液体。微晾干沉淀, 但不宜过分干燥。

5. 加入 100 微升 TE，完全溶解沉淀。标记好的探针最好立即使用，最长使用时间一般不宜超过 3 天。标记好的探针可以保存在 -20°C 。

三、EMSA 胶的配制

1. 准备好倒胶的模具。可以使用常规的灌制蛋白电泳胶的模具，或其它适当的模具。最好选择可以灌制较薄胶的模具，以便于干胶等后续操作。为得到更好的结果，可以选择可灌制较大 EMSA 胶的模具。

2. 按照如下配方配制 20 毫升 4% 的聚丙烯酰胺凝胶(注意：使用 29:1 等不同比例的 Acr/Bis 对结果影响不大)。

(1) TBE buffer (10X): 1 毫升。

重蒸水: 16.2 毫升。

(2) 39:1 acrylamide/bisacrylamide (40%,w/v): 2 毫升。

(3) 80% 甘油: 625 微升。

(4) 10% 过硫酸铵 (ammonium persulfate) : 150 微升。

(5) TEMED : 10 微升

3. 按照上述次序加入各个溶液，加入 TEMED 前先混匀，加入 TEMED 后立即混匀，并马上加入到制胶的模具中。避免产生气泡，并加上梳齿。如果发现非常容易形成气泡，可以把一块制胶的玻璃板进行硅烷化处理。

四、EMSA 结合反应

1. 如下设置 EMSA 结合反应

阴性对照反应:

-
- (1) Nuclease-Free Water : 7 微升。
 - (2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。
 - (3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子: 0 微升。
 - (4) 标记好的探针 : 1 微升。
 - (5) 总体积 : 10 微升。

样品反应:

- (1) Nuclease-Free Water : 5 微升。
- (2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。
- (3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子 : 2 微升。
- (4) 标记好的探针: 1 微升。
- (5) 总体积: 10 微升。

探针冷竞争反应:

- (1) Nuclease-Free Water : 4 微升。
- (2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X) : 2 微升。
- (3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子: 2 微升。
- (4) 未标记的探针: 1 微升。
- (5) 标记好的探针: 1 微升。

(6) 总体积：10 微升。

突变探针的冷竞争反应：

(1) Nuclease-Free Water：4 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)：2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子：2 微升。

(4) 未标记的突变探针：1 微升。

(5) 标记好的探针：1 微升。

(6) 体积：10 微升

Super-shift 反应：

(1) Nuclease-Free Water: 4 微升。

(2) EMSA/Gel-Shift 结合缓冲液(5X)：2 微升。

(3) 细胞核蛋白或纯化的转录因子：2 微升。

(4) 目的蛋白特异抗体：1 微升。

(5) 标记好的探针：1 微升。

(6) 总体积：10 微升。

2. 按照上述顺序依次加入各种试剂，在加入标记好的探针前先混匀，并且室温(20-25℃)放置 10 分钟，从而消除可能发生的探针和蛋白的非特异性结合，或者让冷探针优先反应。然后加

入标记好的探针，混匀，室温(20-25°C)放置 20 分钟。

3. 加入 1 微升 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液(无色，10X)，混匀后立即上样。注意：有些时候溴酚蓝会影响蛋白和 DNA 的结合，建议尽量使用无色的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液。如果对于使用无色上样缓冲液在上样时感觉到无法上样，可以在无色上样缓冲液里面添加极少量的蓝色的上样缓冲液，至能观察到蓝颜色即可。

五、电泳分析

1. 用 0.5XTBE 作为电泳液。按照 10V/厘米的电压预电泳 10 分钟。预电泳的时候如果有空余的上样孔，可以加入少量稀释好的 1X 的 EMSA 上样缓冲液(蓝色)，以观察电压是否正常运行。

2. 把混合了上样缓冲液的样品加入到上样孔内。在多余的某个上样孔内加入 10 微升稀释好的 1X 的 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液 (蓝色)，用于观察电泳进行的情况。

3. 按照 10 V/厘米的电压电泳。确保胶的温度不超过 30°C，如果温度升高，需要适当降低电压。电泳至 EMSA/Gel-Shift 上样缓冲液中的蓝色染料溴酚蓝至胶的下缘 1/4 处，停止电泳。

4. 剪一片大小和 EMSA 胶大小相近或略大的比较厚实的滤纸。小心取下夹有 EMSA 胶的胶板，用吸水纸或普通草纸大致擦干胶板边缘的电压液。小心打开两块胶板中的上面一块(注：通常选择先移走硅烷化的那块玻璃板)，把滤纸从 EMSA 胶的一侧逐渐覆盖住整个 EMSA 胶，轻轻把滤纸和胶压紧。滤纸被胶微微浸湿后(大约不足 1 分钟)，轻轻揭起滤纸，这时 EMSA 胶会被滤纸一起揭起来。把滤纸侧向下，放平，在 EMSA 胶的上面覆盖一层保鲜膜，确保保鲜膜和胶之间没有气泡。

5. 干胶仪器上干燥 EMSA 胶。然后用 X 光片压片检测，或用其它适当仪器设备检测。